Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. M. Arnold

Die Wirkung cholinerger Substanzen auf das Mesenchym der Extremitätenknospe des Hühnchens in vitro

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
DIRK HOFBAUER
aus Pforzheim

1984

UNIV.
LEIDEN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536512_0023

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. M. Arnold

Die Wirkung cholinerger Substanzen auf das Mesenchym der Extremitätenknospe des Hühnchens in vitro

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
DIRK HOFBAUER
aus Pforzheim

1984

Dekan:	Professor Dr. med. G. Fichtner
1. Berichterstatter:	Professor Dr. med. U. Drews
2. Berichterstatter:	Professor Dr. med. D. Winne

---

gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Prof.Dr.U. Drews angefertigt. Für sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit und für die zahlreichen Diskussionen gilt ihm mein besonderer Dank.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau A. Show-Klett und den anderen Mitarbeitern des Anatomischen Instituts Tübingen, die meine Arbeit gefördert haben.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	Seite 1
2. Material und Methoden	Seite 6
3. Befunde	Seite 13
3.1. Die Entwicklung der mesenchymalen Zellen aus der Extremitätenknospe *in vitro*	Seite 13
3.1.1. Der Kulturverlauf im Stadium 22 - 23	Seite 13
3.1.2. Der Kulturverlauf im Stadium 24	Seite 13
3.1.3. Der Kulturverlauf im Stadium 19 - 20	Seite 14
3.1.4. Die Kultur von differenzierten Knorpelzellen	Seite 14
3.2. Die Behandlung mit cholinergen Substanzen	Seite 15
4. Diskussion	Seite 20
4.1. Die Entwicklung der mesenchymalen Zellen aus der Extremitätenknospe *in vitro* im Vergleich zur Entwicklung *in vivo*	Seite 20
4.2. Beurteilung der Behandlung mit cholinergen Substanzen	Seite 23
5. Zusammenfassung	Seite 31
6. Abbildungen	Seite 32
7. Tabellen	Seite 41
8. Literaturverzeichnis	Seite 43

1. Einleitung

In allen Organanlagen des Hühnchenembryos tritt während einer bestimmten Entwicklungsphase eine Cholinesterase-Aktivität auf. Das Erscheinen der Cholinesterase steht mit Gestaltungsbewegungen in Zusammenhang. Dies wurde zuerst von DREWS et al. (1967) in einer histochemischen Studie beschrieben.

Auch in der Extremitätenknospe des Hühnchens tritt das Enzym in charakteristischer Weise auf. DREWS und DREWS (1972) wiesen histochemisch bei der Entstehung und Abgrenzung von Knorpelanlagen Cholinesterase-Aktivität nach, die nach erfolgter Abgrenzung der Anlagen wieder verschwindet. Die Cholinesterase-Aktivität erstreckt sich in frühen Stadien auf das Ektoderm und auf die ektodermale Randleiste der Extremitätenknospe. Ab dem Stadium 20 (Stadieneinteilung nach HAMBURGER und HAMILTON, 1951) erscheint die Cholinesterase-Aktivität im Mesenchym. Das Mesenchym beginnt in diesem Stadium sich zu differenzieren. Es entstehen Knorpelanlagen, deren Bildung von einem Anstieg der Cholinesterase-Aktivität begleitet ist. DREWS (1975) bezeichnete diese Cholinesterase als "embryonale Cholinesterase", um sie von derjenigen Cholinesterase abzugrenzen, die im Serum und in der neuromuskulären Verbindung vorkommt. Ab Stadium 25 erscheinen in der Peripherie stark Cholinesterase-aktive Myoblasten. Die einwachsenden Nervenfasern zeigen ebenfalls Cholinesterase-Aktivität.

Cholinesterase wurde auch bei anderen Tierarten während der Embryonalentwicklung gefunden. OZAKI (1974, 1976) entdeckte in einer biochemischen Studie zwei molekulare Formen der Acetylcholinesterase bei Seeigelembryonen. Während der Gastrulation des Teleostfisches Medaka konnten von FLUCK (1978) sowohl Acetylcholin als auch Acetylcholinesterase nachgewiesen werden. Bei *Ciona intestinalis* erscheint die

Acetylcholinesterase während der embryonalen Entwicklung in den Blastomeren und später im Epithelgewebe (MINGATI und FALUGI, 1980).

SCHRÖDER (1980) zeigte bei Hühnchenembryonen durch Polyacrylamid-Elektrophorese, daß die embryonale Cholinesterase der Chondroblasten eine Acetylcholinesterase ist, und daß diese mit der Cholinesterase der Myotome desselben Embryos identisch ist. Er unterstützte damit die Hypothese, daß die Regulation der embryonalen Organentwicklung mit dem cholinergen System verbunden ist.

Auf der Suche nach einem Rezeptor für Acetylcholin in der Hühnchenextremitätenanlage zeigte SCHMIDT (1981), daß sich dort spezifische Acetylcholinrezeptoren vom muscarinartigen Typ befinden. In einem Filterassay konnte er die spezifische Bindung von ^{3}H-Quinuclidinylbenzilat (^{3}H-QNB) in einem Homogenat von Hühnchenextremitätenanlagen des Stadiums 24 nachweisen. ^{3}H-QNB ist ein spezifischer Ligand für muscarinartige Acetylcholinrezeptoren. Andere muscarinartige Sustanzen wie Atropin verdrängten im Gegensatz zu nicotinartigen Substanzen ^{3}H-QNB aus der Bindung.

In der vorliegenden Arbeit soll nun versucht werden, das cholinerge System der embryonalen Hühnchenextremität mit cholinergen Substanzen *in vitro* zu beeinflussen. Es soll die Wirkung dieser Substanzen auf die Entwicklung und Differenzierung einer disaggregierten mesenchymalen Zellsuspension, die auf Gewebekulturplatten gezüchtet wird, untersucht werden.

Ein solches Kultursystem wurde bereits in anderen Arbeiten verwandt. UMANSKY (1966) beobachtete die Differenzierung von Mesenchymzellen aus der Extremitätenknospe der Maus, indem er eine Einzelzellsuspension auf einem Millipore-Filter züchtete. Nach der Aussaat entstanden,

je nach Zelldichte, freiliegende Einzelzellen, die sich nicht differenzierten, einschichtige Zellbezirke, auf denen sich Muskelzellen entwickelten und mehrschichtige Zellaggregate, die sich zu Knorpel differenzierten. Er vermutete, daß die Differenzierung der Mesenchymzelle von dem sie umgebenden Zellverband abhängt.

Um die Beziehung zwischen Gestaltungsbewegungen und Cholinesterase-Aktivität bei mesenchymalen Zellen aus der Hühnchenextremität in vitro zu erforschen, wurden von DREWS und DREWS (1973) disaggregierte Zellen, die von Embryonen des Stadiums 23 - 24 stammten, für dreieinhalb Tage auf Gewebekulturschälchen (Ø 35 mm) gezüchtet. Die praesumptiven Knorpelzellen durchlaufen in ihrer Entwicklung drei Phasen mit unterschiedlichem Bewegungsverhalten. In der ersten Phase bewegen sich die Cholinesterase-negativen Zellen nach dem Prinzip der "contact inhibition" (ABERCROMBIE, 1961) radiär nach außen. Es entstehen dadurch flache Zellbezirke. Mit dem Auftreten der positiven Cholinesterase-Aktivität in der zweiten Phase zeigen diese Zellen ein anderes Bewegungsverhalten. Ihre Haftung wird gegenüber anderen Zellen erhöht, was zur Abschwächung der radiären Auswärtsbewegungen und zur Bildung von Aggregationen führt. In der dritten Phase ändern die Cholinesterase-posiviten Zellen ihre Lage und Gestalt nicht mehr. Dies scheint die Voraussetzung für die von nun an erfolgende Ablagerung von Knorpelgrundsubstanz und die Ausbildung fester Zellkontakte zu sein. Die Cholinesterase-aktiven Myoblasten zeigen ein ähnliches Bewegungsverhalten wie die Chondroblasten. In den Zellkulturen entwickeln sich Knorpelhäufchen, die von Muskelzellen umgeben sind. Die Knorpelorganoide und die Muskelzellen liegen auf einem Rasen von undifferenzierten Zellen.

SOLURSH und REITER (1980) beobachteten eine Hemmung der Knorpeldifferenzierung in Mesenchym aus Extremitätenknospen des Stadiums 23 - 24 durch gleiche Zellen des früheren Stadiums 19 und zeigten damit, daß eine gegenseitige Beeinflussung der Zellen bei der Knorpelentwicklung erfolgt.

Einige Arbeiten beschäftigten sich mit dem Einfluß pharmakologischer Substanzen auf die Differenzierung von Knorpel in Mesenchym aus Extremitätenknospen in vitro. Eine mesodermale Zellkultur aus Hühnchenextremitätenknospen wurde von CAPLAN (1970) mit teratogenem 3-Acetylpyridin behandelt. Eine Zunahme der Knorpelbildung und eine Abnahme der Myoblastenproliferation wurde beobachtet. Diese Wirkungen konnten durch Nicotinamid neutralisiert werden. Mäuseserum hemmt im Gegensatz zu anderen erprobten Tierseren das Knorpelwachstum bei Hühnchenextremitätenzellen (PARKER et al., 1980); Lectine bewirken eine verstärkte Zelladhäsion, wodurch ein Anstieg der Zahl der gebildeten Knorpelhäufchen resultiert (MATSUTANI und KURODA, 1981).

Wirkungen cholinerger Substanzen auf die Embryonalentwicklung wurden von mehreren Autoren beschrieben. GUSTAFSON und TONEBY (1970) fanden bei Serotonin-Antagonisten und bei Acetylcholin-Antagonisten hemmende Effekte auf die Gestaltentwicklung des Seeigelembryos bei der Gastrulation. Embryonale Zellen des Medaka wurden von FLUCK et al. (1980) in vitro mit d-Tubocurarin und Carbamylcholin behandelt. D-Tubocurarin bewirkte eine Abnahme der Zellaggregation, Carbamylcholin eine Zunahme der Zellaggregation. FLINT (1980) konnte eine Zunahme der Knorpelbildung bei Mesenchymzellkulturen aus Extremitätenknospen der Ratte feststellen, wenn der Cholinesterasehemmstoff Eserin zugegeben wurde.

Cholinerge Substanzen zeigen teratogene Wirkungen auf Hühnchenembryonen in vivo. Carbachol und Neostigmin bewirken muskuläre Hypoplasien und Mißbildungen der Wirbelsäule (LANDAUER, 1977). Atropin verursacht Gastroschisis, Hirnmißbildungen und Extremitätenmißbildungen (MC BRIDE, 1980). PENNER und BRICK (1977) stellten bei Behandlung mit Atropin bei Hühnchenembryonen im Primitivstreifenstadium eine Verdickung des Primitivstreifens fest, während Gewebedefekte im Mesenchym und Entoderm auftraten. Pilocarpin konnte diese Wirkung von Atropin aufheben. Atropin hemmt hierbei möglicherweise als anticholinerge Substanz die Wanderung der von DREWS et al. (1966) beschriebenen Cholinesterase-positiven Tropfenzellen und bewirkt dadurch die Veränderungen.

In dieser Arbeit werden disaggregierte Extremitätenzellen von Hühnchenembryonen auf Gewebekulturplatten gezüchtet. Es werden die Cholinesterase-aktiven Stadien 22 - 23 und 24, sowie das frühe Cholinesterase-negative Stadium 19 - 20 verwendet. Außerdem werden Kulturen mit Cholinesterase-negativen differenzierten Knorpelzellen angelegt. Acetylcholin-Agonisten und Acetylcholin-Antagonisten werden dem Kulturmedium in unterschiedlichen Konzentrationen beigegeben. Die Kulturen werden zusammen mit unbehandelten Kontrollkulturen zumeist drei Tage im Brutschrank gezüchtet und täglich unter dem Mikroskop beobachtet. Langzeitkulturen werden ebenfalls angelegt, die vier und sechs Tage gezüchtet werden. Nach Fixation wird die Cholinesterase-Aktivität nach der Methode von KARNOVSKY und ROOTS (1964) histochemisch sichtbar gemacht, die Knorpelgrundsubstanz durch Metachromasie-Färbung mit Dimethylmethylenblau dargestellt. Anschließend wird die Morphologie der verschiedenen Zellkulturen, die Cholinesterase-Aktivität und die Knorpelanfärbung mikroskopisch beurteilt.

2. Material und Methoden

Angaben über Herkunft und Zusammensetzung der verwendeten Materialien, Lösungen und Pharmaka folgen am Ende dieses Abschnittes. Die in Klammer gesetzten Zahlen weisen jeweils darauf hin.

Befruchtete Hühnereier, die vom Schloßgut Laupheim bei Ulm geliefert worden waren, wurden in einem Inkubator (Fa. Ehret) mit Wendevorrichtung bei 39,8° C und 60 % Luftfeuchtigkeit bebrütet. Die Dauer der Bebrütung lag zwischen drei und vier Tagen je nach gewünschtem Stadium.

Die Hühnchenembryonen der Stadien 19, 22 - 23, 24 (Stadieneinteilung nach HAMBURGER und HAMILTON, 1951) wurden aus den Eiern entnommen und in Tyrode-Lösung (1) übertragen. Nach Entfernung der Eihäute wurden die Embryonen in Schälchen mit frischer Tyrode-Lösung umgesetzt. Die weitere Verarbeitung erfolgte unter sterilen Bedingungen mit dem Stereomikroskop (Fa. Zeiss). Die Extremitätenknospen wurden an der Basis abgeschnitten (Graphische Darstellung in Abb. 1) und zu ca. 30 Stück in Grobsteinschälchen mit Tyrode-Lösung gesammelt. Jedes Schälchen wurde mit Ca-Mg-freier Hanks-Lösung (2) zweimal gespült. Anschließend wurden die Knospen in Trypsin-Pankreatin-Lösung (3) überführt und im Kühlschrank bei 4° C für 45 - 60 Minuten inkubiert. Danach wurden die Ektodermhüllen der Extremitätenknospen durch Auf- und Niedersaugen mit Haarkapillaren, deren Durchmesser dem der Extremitätenknospen (Ø ca. 1 mm) entsprach, vom mesenchymalen Kern gelöst. Nun wurden die Ektodermhüllen zusammen mit der Trypsin-Pankreatin-Lösung abgezogen. Den verbleibenden Mesenchymkernen wurde ein Pferdeserum (4) / Kulturmedium (5)-Gemisch (1:1) für fünf Minuten zugesetzt, anschließend nach Abzug dieser Lösung Kulturmedium zugegeben. Die Schälchen wurden für wenige Minuten im Inkubator (Fa. Heraeus) bei 37° C, 5 %-CO_2-

Begasung und 95 % Luftfeuchtigkeit gelagert. Danach wurden die Mesenchymkerne der Extremitätenknospen mit doppelt ausgezogenen Haarkapillaren (Ø 0,2 - 0,1 mm) disaggregiert. Die so entstandene Zellsuspension wurde nach weiterer Kulturmediumzugabe in eine Spritze aufgezogen und durch ein Nylonnetzfilter (6) in ein Spitzglas gedrückt. Die Zellsuspension wurde mit Kälberserum (7) / Kulturmedium-Gemisch (1:1) unterschichtet und bei 400 rpm 30 Minuten zentrifugiert. Nach Abziehen des Überstandes wurden die Zellen mit Kulturmedium resuspendiert, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und durch Zugabe weiteren Kulturmediums die benötigte Verdünnung von ca. $1,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml hergestellt.

Die Zellsuspension wurde mit Eppendorf-Pipetten in die Löcher der 96-Loch-Testplatten (8) pipettiert. Ein Loch enthielt 0,2 ml Suspension. Die Behandlung mit den cholinergen Substanzen (9) wurde gleich nach Aussaat der Zellen in die Testplatten durchgeführt. Die Pharmaka wurden zuvor in Tyrode-Lösung gelöst und durch Filtration (10) sterilisiert. Quinuclidinyl-Benzoat wurde nicht in Tyrode-Lösung sondern in einer gesättigten Salzlösung (11) gelöst. Die weitere Verdünnung der Pharmaka zur Herstellung der benötigten Konzentrationen wurde mit Tyrode-Lösung durchgeführt. Ein Loch erhielt 0,02 ml Medikamentenlösung mit einer Eppendorfpipette. Sechs oder acht Löcher in einer Reihe auf den Testplatten wurden gleich behandelt. Im Stadium 19 - 20 wurden wegen dem knappen Zellmaterial nur drei Löcher gleich behandelt. In zwei bis drei Lochreihen wurde nur Tyrode-Lösung statt eines Pharmakons zugegeben, um vergleichbare Kontrollkulturen zu haben (siehe hierzu auch Abb. 14).

Die differenzierten Knorpelzellen stammten aus sieben (Stadium 31) und zwölf (Stadium 37) Tage alten bebrüteten Hühnchen. Die Extremitätenknorpel im Stadium 31 und der Sternalknorpel im Stadium 37 wurden mit dem Skalpell frei-

präpariert und entnommen. Die Knorpelstücke wurden zerkleinert und anschließend 75 Minuten in Kollagenaselösung (12) inkubiert. Dabei wurde die Lösung auf einem Magnetrührer mit einem Rührfisch gerührt. Anschließend wurde die Einzelzellsuspension abgezogen. Noch vorhandenen Reststücken wurde erneut Kollagenaselösung zugegeben, dann wurde für weitere 30 Minuten bis zum Zerfall aller Gewebsstücke gerührt. Die so erhaltene Einzelzellsuspension wurde wie oben geschildert zentrifugiert. Ein Teil der nach Zentrifugation erhaltenen Suspension wurde nach Resuspension mit Kulturmedium in eine 96-Loch-Testplatte ausgesät. Ein anderer Teil wurde zuerst in 35 mm-Plastikschälchen (Fa. Greiner & Söhne) kultiviert (siehe Befundabschnitt). Vor der Oberführung in die 96-Loch-Testplatte wurden diese Kulturen mit Tyrode-Lösung abgespült und mit Dispaselösung (13) bei 5%iger CO_2-Begasung im Brutschrank bei 37° C behandelt. Der Zellayer wurde danach mit einem Jonenbesen abgeschabt, mit doppelt ausgezogenen Haarkapillaren disaggregiert und nach Zentrifugation in die 96-Loch-Testplatte ausgesät. Die Zelldichte war bei den verschiedenen Experimenten unterschiedlich. Die Pharmakonzugabe erfolgte hier erst nach Ausbildung eines dichten und homogenen Zellayers in der oben beschriebenen Weise.

Testplatten und 35 mm-Plastikschälchen wurden bei 37° C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit in einem Heraeus-Inkubator inkubiert.

Vor der Fixation wurden die Kulturen mit Tyrode-Lösung abgespült, dann in 4 %igem Formol - Ca (1 %) bei 4° C eine Stunde fixiert, anschließend fünf Minuten in Eiswasser gewässert. Der Cholinesterase-Nachweis erfolgte nach der Methode von KARNOVSKY und ROOTS (1964) mit einer Inkubationszeit von vier bis fünf Stunden bei Zimmertemperatur.

Die Metachromasie-Färbung wurde mit Dimethylmethylenblau (14) nach TOEPFER (1970) durchgeführt.

Um geeignete Beleuchtungsverhältnisse für die photographische Dokumentation zu bekommen, wurden die Löcher der Testplatten nach Wässerung mit Glyzerin gefüllt; die gesamte Testplatte wurde mit einem Deckglas versehen.

Für die Kulturbeobachtung und Dokumentation wurde das Inverse Mikroskop IM 35 von Zeiss verwendet. Eine Photokamera (Contax RTS) für die Aufnahmen war am Mikroskop angebracht. Die Flächenausmessung der Knorpelhäufchen wurde mit dem MOP AMO 2 der Fa. Kontron durchgeführt.

1. Tyrode-Lösung:

NaCl	8,00 g/l
KCL	0,20 g/l
$CaCl_2$	0,20 g/l
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,10 g/l
$NaHCO_3$	1,00 g/l
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0,05 g/l
Glucose	1,00 g/l

pH-Einstellung auf 7,2 - 7,3

2. Ca - Mg - freie Hanks-Lösung:

NaCl	8,00 g/l
KCl	0,40 g/l
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0,06 g/l
KH_2PO_4	0,06 g/l
Glucose	1,00 g/l
$NaHCO_3$	0,35 g/l

pH-Einstellung auf 7,2 - 7,3

3. Trypsin-Pankreatinlösung:
   2,25 % Trypsin (Fa. Difco, 1:250)
   0,75 % Pankreatin (Fa. Difco)
   in 100 ml Ca - Mg - freier Hankslösung
   bei 37° C gelöst.

4. Pferdeserum der Fa. Seromed

5. Kulturmedium:
   89,5 ml MEM Dulbecco einfach ohne Glutamin
   plus 3,7 g/l $NaHCO_3$ (Fa. Seromed)
   10 ml fetales Kälberserum (Fa. Seromed)
   0,5 ml Penicillin-Streptomycin (50 E/ml;
   Fa. Difco)
   1,0 ml Glutamin 5 % (Fa. Difco)

6. Nylonnetzfilter:
   Swinnex-Filterhalter der Fa. Millipore mit Nylonnetz
   der Fa. Reichelt (30 µm)

7. Fetales Kälberserum der Firma Seromed

8. 96-Loch-Testplatte:
   Micro Test II, Tissue Culture Plate, 96 Flat bottom
   wells (Fa. Falcon). Lochdurchmesser: 7 mm

9. Pharmaka:
   Atropinium-Sulfat (Fa. Merck), Bethanechol-Chlorid (Fa. Sigma), Carbamoylcholin-Hydrochlorid (Fa. Merck), Chlorpromazin (Fa. Sigma), DL-Muscarin-Chlorid (Fa. Serva), Oxotremorin-Sesquifumarat (Fa. Serva), Physostigmin-Salicylat (= Eserin; Fa. Serva), Pilocarpinium-Chlorid (Fa. Merck), ($\pm$)-3-Quinuclidinyl-Benzoat (Fa. Sigma), Scopolamin-N- Butylbromid (Fa. Sigma), Scopolamin-Methylbromid (Fa. Sigma), Tremorin-Dihydrochlorid (Fa. Sigma).
   Die Pharmaka wurden nach dem höchst möglichen Reinheitsgrad ausgewählt.

10. Sterilisationsfilter:
    Milex-GS (0,22 µm) der Fa. Millipore

11. Gesättigte Salzlösung für Quinuclidinyl-Benzoat:
    493 mg NaCL gelöst in 100 ml NaK-Phosphatpuffer (1,334 g/l KH_2PO_4 und 7,154 g/l $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$); pH auf 7,4 eingestellt. Diese Verbindung wurde anstelle von unmarkiertem QNB eingesetzt, da unmarkiertes QNB nicht erhältlich war. Die später durchgeführten Bindungsstudien haben jedoch gezeigt, daß die Substanz keine spezifische Aktivität zum muscarinartigen Rezeptor besitzt (Schmidt, persönliche Mitteilung).

12. Kollagenaselösung:
    10 mg Kollagenase der Fa. Boehringer in 10 ml Tyrode-Lösung gelöst.

13. Dispaselösung:
    5 mg Protease neutral der Fa. Boehringer in
    25 mg Ca - MG - freier PBS-Lösung gelöst.
    PBS = Phosphor buffered saline:

NaCl	8,0 g/l
KCl	0,2 g/l
KH_2PO_4	0,2 g/l
Na_2HPO_4	1,15 g/l

    pH auf 7,2 eingestellt

14. Dimethylmethylenblaulösung:
    0,01 g 1,9-Dimethylmethylenblau (Fa. Serva)
    ad 100,0 ml aqua dest.

3. Befunde

3.1. Die Entwicklung der mesenchymalen Zellen aus der Extremitätenknospe *in vitro*

3.1.1. Der Kulturverlauf im Stadium 22 - 23

Das Zellmaterial im Stadium 22 bis 23 enthält nach Disaggregation und Filtration eine Zellsuspension, die überwiegend aus Einzelzellen und aus wenigen Konglomeraten von zwei bis drei Zellen besteht. Nach dem Aussäen auf die Kulturplatten (96 Loch-Testplatten) setzen sich die Zellen am Boden ab. Sie vermehren sich rasch; innerhalb weniger Stunden entsteht eine homogene Zellschicht (Abb. 2 A). Nach zwei Tagen werden runde Zellhäufchen aus Chondroblasten, in deren Umgebung sich Myoblasten befinden, sichtbar. Es wird damit die *in vivo* bestehende Lagebeziehung zwischen Knorpelgewebe und Muskelgewebe nachgebildet (Abb. 3 A; DREWS und DREWS, 1972). Nach Fixation der Kulturen am dritten Tag und nach Cholinesterase-Darstellung zeigen die Knorpelhäufchen eine deutliche Braunfärbung, die im Zentrum am stärksten ist; ebenso färben sich die Muskelzellen braun an und weisen damit eine positive Cholinesterase-Aktivität auf (Abb. 4). Wenn die Kultur am vierten Tag fixiert wird und eine Metachromasie-Färbung mit Dimethylmethylenblau durchgeführt wird, besitzen die Knorpelhäufchen eine Rotfärbung, die die Bildung von Knorpelgrundsubstanz der Knorpelhäufchen anzeigt. Kulturen, die sechs Tage lang gezüchtet werden, zeigen das gleiche Bild, färben sich jedoch intensiver rot an (Abb. 6).

3.1.2. Der Kulturverlauf im Stadium 24

Diese Kulturen entwickeln sich wie die Kulturen des Stadiums 22 - 23. Nach drei Tagen Kulturdauer wird

dieselbe Cholinesterase-Aktivität wie bei Kulturen des Stadiums 22 - 23 beobachtet.

3.1.3. Der Kulturverlauf im Stadium 19 - 20

Die Zellen vermehren sich nach Aussaat auf die 96-Loch-Testplatte rasch. Nach zwei bis drei Tagen haben sich Knorpelhäufchen gebildet, die von Muskelzellen umgeben sind (Abb. 8 A). Nach vier Tagen zeigen die Kulturen ein ähnliches Bild wie Zellen des Stadiums 22 - 23 nach drei Tagen. Die Häufchen und die Muskelzellen besitzen dann eine positive Cholinesterase-Aktivität. Eine längere Kultivierung dieser Zellen und eine Knorpeldarstellung wurde nicht durchgeführt.

3.1.4. Die Kultur von differenzierten Knorpelzellen

Die Zellen stammen bei einem Experiment von Hühnchenextremitätenknorpel des Stadiums 31, bei einem weiteren Experiment von Knorpel des Sternums von Hühnchen des Stadiums 37. Bei dem ersten Experiment wird nach Disaggregation ein Teil der Einzelzellsuspension auf einer 96-Loch-Testplatte ausgesät und acht Tage lang kultiviert. Der andere Teil der Suspension wird in geringer Zelldichte auf 35 mm-Plastikschälchen ausgesät und nach 13 Tagen Kulturdauer erneut disaggregiert, danach in eine 96-Lochplatte umgesetzt und noch zwei Tage lang kultiviert. Bei dem zweiten Experiment wird die disaggregierte Knorpelzellsuspension auf 35 mm-Plastikschälchen ausgesät. Nach drei Tagen Kulturdauer werden die Zellen wegen der inzwischen sehr hohen Zelldichte erneut disaggregiert und auf mehrere andere 35 mm-Plastikschälchen umgesetzt. Nach neun Tagen werden die Zellen nach Disaggregation auf 96-Loch-Testplatten überführt und noch zwei Tage lang gezüchtet.

Bei beiden Experimenten vermehren sich die Knorpelzellen sowohl in den 35 mm-Plastikschälchen als auch in den 96-Loch- Testplatten nach Aussaat rasch und bilden bald eine homogene Zellschicht (Abb. 9). Nach Fixation wird eine Metachromasie-Färbung mit Dimethylmethylenblau durchgeführt. Die Knorpelgrundsubstanz ist gut darstellbar und erstreckt sich gleichmäßig über die Kultur. In manchen Löchern löste sich der Zellayer beim Abziehen des Nährmediums vor der Fixation wegen der sehr hohen Zelldichte ab. Diese Löcher waren deswegen für die Auswertung nicht verwendbar.

3.2. Die Behandlung mit cholinergen Substanzen

Aus Tabelle 1 ist die Anzahl der durchgeführten Experimente bei den verschiedenen Stadien und die Konzentrationen der verwandten Pharmaka ersichtlich. Nicht aufgeführt sind dort Bethanechol, Butylscopolamin, Methylscopolamin, Muscarin und Oxotremorin. Diese wurden nur in einem Experiment bei mesenchymalen Zellkulturen des Stadiums 22 - 23 verwandt.

Die Substanzen Atropin, Carbachol, Eserin, Pilocarpin und Quinuclidinyl-Benzoat können in einer Konzentration, die bei oder unter 10^{-4} M liegt, keine Veränderungen des Kulturverlaufs bewirken. Ebenso kann bei Behandlung mit Bethanechol (10^{-3} M, 10^{-4} M), Butylscopolamin (10^{-3} M, 10^{-4} M), Methylscopolamin (10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M), Muscarin (10^{-4} M, 10^{-5} M) und Oxotremorin (10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M) keine Wirkung auf die Kulturentwicklung beobachtet werden.

Die mesenchymalen Zellkulturen des Stadiums 22 - 23, denen gleich nach Aussaat die Substanzen in den verschiedenen Konzentrationen zugesetzt werden, lassen nach einem Tag keine Unterschiede im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollkulturen erkennen (Abb. 2 B und Abb. 2 C). Die

Differenzierung in Knorpelhäufchen und Muskelzellen verläuft in gleicher Weise bis zum zweiten Tag (Abb. 3 B). Anzahl, Größe und Morphologie der Knorpelhäufchen und Muskelzellen zeigen auch bis zu einer Kulturdauer von sechs Tagen das gleiche Bild wie unbehandelte Kulturen. Bei Darstellung der Cholinesterase-Aktivität am dritten Tag und bei Darstellung der gebildeten Knorpelgrundsubstanz mit Dimethylmethylenblau am vierten und sechsten Tag sind Veränderungen ebenfalls nicht erkennbar (Abb. 5, Abb. 7). Bei den mit Eserin behandelten Kulturen ist die Cholinesterase-Aktivität vollständig gehemmt. Dies ist jedoch darauf zurückzuführen, daß die Hemmung der Cholinesterase durch Eserin durch die Spülschritte nicht beseitigt wurde. Ein Einfluß des Eserins auf die Differenzierung läßt sich nicht beobachten. Die mit Eserin behandelten Kulturen zeigen eine mit anderen Kulturen vergleichbare Metachromasie bei Dimethylmethylenblau-Färbung. Bei behandelten Kulturen des Stadiums 24 wird der gleiche Kulturverlauf wie bei Stadium 22 - 23 beobachtet. Die Kulturen des Stadiums 19 - 20 zeigen bei Behandlungen (Tabelle 1) ebenfalls keinen Unterschied in der Entwicklung im Vergleich zu unbehandelten Kulturen des Stadiums 19 - 20 (Abb. 8 B). Auch die determinierten Knorpelzellen entwickeln sich unter den Behandlungen (Tabelle 1) wie die unbehandelten Kontrollkulturen. Knorpelbildung kann hier in der gleichen Intensität wie bei Kontrollkulturen nachgewiesen werden.

Der Kulturverlauf bei Behandlung mit Chlorpromazin in der Konzentration von 10^{-4} M und 10^{-3} M und bei Behandlung mit Atropin, Eserin, Pilocarpin und Quinuclidinyl-Benzoat in verschiedenen Konzentrationen über 10^{-4} M unterscheidet sich von dem Kulturverlauf der unbehandelten Kulturen (siehe hierzu Tabelle 1). Bei Zellkulturen des Stadiums 22 - 23 und 24 wird innerhalb von 24 Stunden eine Schrumpfung und Abrundung der Muskelzellen sichtbar.

Entweder findet jetzt eine Weiterentwicklung der Zellkultur mit positiver Cholinesterase-Aktivität nach drei Tagen und positiver Darstellung der Knorpelgrundsubstanz nach vier und sechs Tagen bei fortbestehender Abrundung der Muskelzellen statt (Abb. 10), oder die gesamten Zellen der Kultur reagieren mit Zelltod. Sie runden sich ab und lösen sich vom Boden der Kulturplatte. Die Fibrozyten bleiben für etwas längere Zeit ausgebreitet am Boden haften, doch auch sie zeigen Schädigungen (Abb. 11). Eine Weiterentwicklung der Kultur bei bestehender Muskelzellabrundung tritt bei Behandlung mit Quinuclidinyl-Benzoat in jeder Konzentration auf. Bei Behandlung mit Atropin, Pilocarpin und Eserin können in Konzentrationen zwischen 10^{-3} M und 10^{-4} M beide oben beschriebenen Möglichkeiten eintreten, doch besteht bei höheren Konzentrationen eine Tendenz zum Zelltod. Der Grenzkonzentrationsbereich zeigt hierbei eine hohe Schwankungsbreite. Chlorpromazin bewirkt in den Konzentrationen von 10^{-4} M und 10^{-3} M den Zelltod.

Die determinierten Knorpelzellkulturen reagieren auf Behandlung mit diesen Substanzen (Tabelle 1) ebenfalls mit Abrundung und Ablösung vom Boden durch Zelltod (Abb. 12). Bei niedrigeren Konzentrationen, die diesen Effekt nicht bewirken, geschieht eine Weiterentwicklung ohne Beeinträchtigung der Knorpelbildung. Quinuclidinyl-Benzoat hat keine Wirkung auf die Entwicklung der differenzierten Knorpelzellen.

Tremorin hat in der Konzentration von 10^{-4} M keinen Einfluß auf das Wachstum der Zellkulturen des Stadiums 22 - 23 und auf die Cholinesterase-Aktivität dieser Kulturen. Bei Behandlung mit einer Konzentration von 10^{-3} M sind die Zellkulturen nach kurzer Zeit von gebildeten Vakuolen übersät. Dies ergibt das Bild einer Pflastersteinstruktur, die Differenzierung der Zellen ist gestört (Abb. 13). Ablösung vom Boden tritt nicht auf, so daß der

Zellayer erhalten bleibt. Die Behandlung von determinierten Knorpelzellen und Zellen sonstiger Stadien wurde mit Tremorin nicht durchgeführt.

Nach Behandlung mit Carbachol in den in Tabelle 1 angeführten Konzentrationen zeigen die Zellkulturen aller Stadien keine Änderung des Kulturverlaufs im Vergleich zu Kontrollkulturen. Bei der mikroskopischen Beobachtung ergibt sich nach zwei Tagen das gleiche Bild: Zahlreiche Knorpelhäufchen sind sichtbar, die von Muskelzellen umgeben werden. Zellabrundung und Ablösung - wie oben bei anderen Pharmaka beschrieben - treten bei Carbacholbehandlung nicht auf. In einem Experiment bei Kulturen des Stadiums 19 - 20 und in drei Experimenten bei Kulturen des Stadiums 22 - 23 wurde festgestellt, daß bei Darstellung der Cholinesterase-Aktivität am dritten Tag eine erhebliche Zunahme der Aktivität im Vergleich zu den unbehandelten Zellkulturen erscheint. Die verstärkte Cholinesterase-Aktivität betrifft sowohl Knorpelhäufchen als auch Muskelzellen. In Abbildung 14 wird die auftretende Abstufung der Cholinesterase-Aktivität, die von der Höhe der Carbacholkonzentration direkt abhängt, in abnehmender Braunfärbung sichtbar. Bei einer Carbacholkonzentration von 10^{-6} M gleicht die Braunfärbung nahezu der Färbung der Kontrollkulturen. In einem Experiment bei Stadium 22 - 23 und in dem Experiment bei Stadium 24 war der Carbacholeffekt nicht nachweisbar. Werden die mit Carbachol behandelten Kulturen nach vier und sechs Tagen mit Dimethylmethylenblau angefärbt, so zeigen sie die gleiche Knorpelgrundsubstanzbildung wie die Kontrollgruppen. Eine verstärkte Bildung von Knorpelgrundsubstanz unter Carbacholeinfluß ist nicht erkennbar. Ausmessungen der Fläche der Knorpelhäufchen ergeben auch bei statistischer Auswertung keine Unterschiede zwischen den mit Carbachol behandelten Kulturen, die den Carbacholeffekt zeigen, und den unbehandelten Kontrollkulturen. Die erhaltenen Werte sind auf Säulendiagrammen in der Abbildung

15 dargestellt. Bei der Zählung der Anzahl der Muskelzellen pro Flächeneinheit treten ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den mit Carbachol behandelten Kulturen und den unbehandelten Kulturen auf (Tabelle 2).

4. Diskussion

4.1. Die Entwicklung der mesenchymalen Zellen aus der Extremitätenknospe *in vitro* im Vergleich zur Entwicklung *in vivo*

In vivo wurde die Knorpelentwicklung von SEARLS, HILFER und MIROW (1972), die Muskelentwicklung von HILFER, SEARLS und FONTE (1973) untersucht. Die Mesenchymzellen sind bei der Entwicklung *in vivo* bis zum Stadium 21 - 22 morphologisch nicht differenzierbar. Ab dem Stadium 23 - 24 können Zellen der knorpelbildenden Region von dorsal und ventral liegenden Zellen der muskelbildenden Region abgegrenzt werden. Knorpelgrundsubstanz ist ab dem Stadium 25 - 26 durch Metachromasie-Färbung nachweisbar. Jetzt beginnt auch die Fusionierung von Muskelzellen, die eine sichtbare Querstreifung ab Stadium 27 besitzen. Die Bildung von Myofilamenten wird sichtbar.

DREWS und DREWS (1972) beschrieben das Auftreten der Cholinesterase-Aktivität bei der Extremitätenentwicklung des Hühnchens (siehe Einleitung). *In vivo* titt die Cholinesterase-Aktivität im Mesenchym der Extremität ab Stadium 20 auf. Mit dem Erscheinen der Knorpelanlagen im Stadium 23 - 24 wird in der knorpelbildenden Region eine Zunahme der Cholinesterase-Aktivität nachweisbar. Cholinesterase-positive Myoblasten können ab dem Stadium 25 beobachtet werden. Die Cholinesterase-Aktivität sinkt in den bereits gebildeten Knorpelanlagen ab dem Stadium 27. Wie in der Einleitung bereits genauer geschildert ist *in vitro* bei disaggregierten mesenchymalen Extremitätenzellkulturen die Cholinesterase-Aktivität ebenfalls mit der Differenzierung von Knorpelorganoiden und quergestreiften Muskelzellen verbunden (DREWS und DREWS, 1973). Bei Zellen des Stadiums 23 und 24 wurde eine positive Cholinesterase-Aktivität in den Knorpelhäufchen bereits nach zehn Stunden Kulturdauer beobachtet. Die Cholinesterase-Aktivität hat nach zweieinhalb Tagen in

den Knorpelhäufchen und Muskelzellen ihr Maximum erreicht und nimmt schon nach dreieinhalb Tagen wieder ab. Ab diesem Zeitpunkt ist Knorpelgrundsubstanz deutlich nachweisbar.

CHRIST et al. (1979) konnten zeigen, daß die mesenchymalen Zellen der Hühnchenextremität eine unterschiedliche Herkunft haben. Durch interspezifische Transplantationsexperimente mit Wachtel- und Hühnchenembryonen stellten sie fest, daß die Muskelzellen der Extremitätenanlagen von Zellen abstammen, die aus den Somiten in die Extremität eingewandert sind. Alle übrigen Extremitätenzellen, also auch die Knorpelzellen, haben im Somatopleuramesoderm ihren Ursprung.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei den in vitro durchgeführten Experimenten mit mesenchymalen Zellen des Stadiums 22 - 23 nach zwei Tagen Kulturdauer Knorpelhäufchen sichtbar, die von Muskelzellen umgeben waren. Da bei der Extremitätenentwicklung in vivo jedoch ab Stadium 23 -24 Knorpelanlagen bereits sichtbar werden, liegt zwischen der Knorpelanlagenentwicklung in vitro und in vivo eine Zeitdifferenz von zwei Tagen. Die sehr zahlreichen Knorpelhäufchen werden immer in einer runden Form gebildet und liegen gleichmäßig verteilt am Boden der Kulturplatte. Die Muskelzellen umgeben einzeln und in ungeordneter Verteilung die Knorpelhäufchen. Wie die Extremitätenknospen in vivo differenzieren sich die mesenchymalen Zellkulturen zu Knorpelhäufchen und Muskelzellen. In vitro erreicht die Cholinesterase-Aktivität in den Knorpelhäufchen bei Kulturen des Stadiums 22 - 23 nach drei Tagen Kulturdauer ihr Maximum. Dies ist bei der Entwicklung in vivo bereits im Stadium 24 -25 der Fall, was in vitro einer Kulturdauer von nur einem Tag bei Kulturen des Stadiums 22 - 23 entsprechen würde.

Hier liegt ebenfalls eine Zeitdifferenz von zwei Tagen zwischen der Entwicklung in vitro und der Entwicklung in vivo vor. Die gleichen zeitlichen Entwicklungsunterschiede von zwei Tagen sind auch bei dem Auftreten von Knorpelgrundsubstanz vorhanden. Diese erscheint in vivo ab dem im Vergleich zum Stadium 22 - 23 eineinhalb Tage älteren Stadium 25 - 26. Bei der Entwicklung in vitro von Kulturen des Stadiums 22 - 23 kann sie erst nach dreieinhalb Tagen Kulturdauer beobachtet werden. Kulturen des Stadiums 24 zeigen dieselbe zeitliche Entwicklung wie Kulturen des Stadiums 22 - 23.

Kulturen des Stadiums 19 - 20, die also einen Tag jünger als Kulturen des Stadiums 22 - 23 sind, besitzen nach vier Tagen Kulturdauer eine ausgeprägte Cholinesterase-Aktivität, die mit der nach drei Tagen auftretenden Aktivität von Kulturen des Stadiums 22 - 23 vergleichbar ist. Diese Kulturen benötigen also ebenfalls eine um zwei Tage längere Zeitdauer, um die Entwicklungsphase zu erreichen, die der Entwicklung in vivo entspricht.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die disaggregierten mesenchymalen Extremitätenzellkulturen in vitro bezüglich der Differenzierung in Knorpelhäufchen und Muskelzellen die Entwicklung der Extremitäten in vivo nachahmen. Die in vivo auftretende charakteristische Formbildung der Knorpelkerne und Muskelstränge wird von den Kulturen in vitro jedoch nicht nachgebildet. Bei allen beobachteten Entwicklungsschritten in vitro tritt ein Zeitverzug von zwei Tagen im Vergleich zu den entsprechenden Entwicklungsvorgängen in vivo auf.

Die beschriebene Zeitdifferenz kann als eine Unterbrechung der normalen Entwicklung angesehen werden, da die darauf folgende Weiterentwicklung der Zellkulturen in einer der Entwicklung in vivo vergleichbaren Geschwindig-

keit verläuft. Der Grund liegt möglicherweise darin, daß durch Loslösung der Zellen aus ihrer natürlichen Umgebung während der Disaggregation das interzelluläre Milieu zerstört wird. Dieses muß nach Aussaat in die Kulturplatten von den Mesenchymzellen erneut geschaffen werden und ist die Voraussetzung für weitere Differenzierungsleistungen. Trotz der Zeitverschiebung kann man davon ausgehen, daß die Differenzierung in vitro der Entwicklung in vivo im wesentlichen entspricht.

4.2. Beurteilung der Behandlung mit cholinergen Substanzen

Nachdem von DREWS und DREWS (1972 u. 1973) bei den mesenchymalen Extremitätenanlagen die Cholinesterase-Aktivität in vivo und in vitro histochemisch charakterisiert, von SCHRÖDER (1980) die Cholinesterase als spezifische Acetylcholinesterase identifiziert und von SCHMIDT (1981) ein spezifischer muscarinartiger Rezeptor nachgewiesen werden konnte, sind somit alle Kriterien für die Existenz eines cholinergen Systems erfüllt. Es war die Absicht dieser Arbeit, dieses System durch Pharmaka zu beeinflussen. Dieses Vorgehen wurde als eine Möglichkeit angesehen, den Zusammenhang des cholinergen Systems mit der Organdifferenzierung in Zellkulturen zu untersuchen, in der Erwartung, daß die Pharmaka Änderungen der Zelldifferenzierung oder der Gestaltentwicklung bewirken könnten. Eine große Anzahl von Substanzen mit Acetylcholin-agonistischer und Acetylcholin-antagonistischer Wirksamkeit wurde benutzt. Das Neuroleptikum Chlorpromazin, das nach MILLER und HILEY (1974) antimuscarinartige Wirkung besitzt, wurde ebenfalls verwendet.

Nur bei der Anwendung von sehr hohen Konzentrationen (über 10^{-4} M) konnten Veränderungen des Kulturverlaufs beobachtet werden. Diese bestanden in einer Abrundung der Muskelzellen und einer anschließenden Abrundung aller Zellen mit Ablösung vom Boden. Diese Zellreaktion trat

bei Behandlung mit Eserin, Atropin, Pilocarpin und Chlorpromazin auf, während Quinuclidinyl-Benzoat nur eine Abrundung der Muskelzellen ohne Ablösung vom Boden bewirkte. Die Zellkulturen aller verwendeten Stadien reagierten auf Behandlung mit einer "Alles oder Nichts" - Reaktion. Entweder blieb die Zellschicht erhalten und es entstanden Knorpelhäufchen, die positive Cholinesterase-Aktivität zeigten und Knorpelgrundsubstanz bildeten, oder es trat eine Abrundung und Ablösung aller Zellen vom Boden auf. Die Muskelzellen reagierten mit Abrundung bereits bei Konzentrationen, die noch keine Ablösung der gesamten Zellschicht verursachten, doch auch sie zeigten bei Behandlung mit niedrigeren Konzentrationen eine normale Entwicklung mit positiver Cholinesterase-Aktivität.

Die beschriebenen Reaktionen der Zellkulturen bei Behandlung können als Zelltod angesehen werden, der durch eine unspezifische toxische Wirkung der Substanzen und nicht durch eine Beeinflussung des cholinergen Systems verursacht wurde. Dafür sprechen mehrere Gründe:

1. Die Zellkulturen, die aus reifem Knorpel der Extremitäten und des Sternums gewonnen wurden, besitzen keine Cholinesterase-Aktivität. Man kann annehmen, daß bei Zellkulturen in diesem Stadium keine Reaktionen auf Behandlung mit cholinergen Substanzen durch spezifische Beeinflussung des cholinergen Rezeptors auftreten dürfen. Diese Kulturen reagierten bei Behandlung mit Pharmaka in den Konzentrationsbereichen, die bei den Cholinesterase-positiven Zellen tödlich wirkten, ebenfalls mit dem Zelltod. Wäre der Zelltod bei den Cholinesterase-positiven Kulturen durch einen spezifischen Einfluß der Pharmaka auf das cholinerge System entstanden, hätte man nicht die gleiche

Reaktion bei den Cholinesterase-negativen Kulturen erwarten können.

2. Bei einer spezifischen Tötungswirkung durch Beeinflussung des cholinergen Systems wäre eine konzentrationsabhängige abstufbare Reaktion der Zellen auf die Behandlung zu erwarten gewesen. Man hätte beispielsweise eine kontinuierlich verlaufende Abnahme der Cholinesterase-Aktivität oder eine kontinuierlich verlaufende Abnahme der Knorpelbildung bei Behandlung mit steigenden Konzentrationen erwartet. Dies konnte bei den durchgeführten Experimenten bei Verwendung von zahlreichen cholinergen Substanzen nicht festgestellt werden. Die Zellkulturen reagierten auf die Pharmakonbehandlung mit der oben beschriebenen "Alles oder Nichts" - Reaktion.

3. Die Konzentrationen der Pharmaka, bei denen der Zelltod auftrat, lagen in sehr hohen Bereichen (5×10^{-4} M bis 10^{-2} M), so daß eine toxische Zellschädigung wahrscheinlich ist. Pharmakologische Wirkungen sind bereits in wesentlich niedrigeren Konzentrationsbereichen zwischen 10^{-7} M bis 10^{-4} M zu erwarten (SNYDER et al., 1975).

4. Der Acetylcholin-Agonist Pilocarpin, der Acetylcholin-Antagonist Atropin und der Cholinesterase-Hemmstoff Eserin bewirkten gleiche Reaktionen der Zellkulturen. Bei pharmakologisch spezifischer Wirksamkeit wären unterschiedliche Wirkungen der verschiedenen Substanzen zu erwarten gewesen. Diese traten jedoch nicht auf. Quinuclidinyl-Benzoat konnte zwar keinen vollständigen Zelltod verursachen, jedoch sind die beobachteten Abrundungserscheinungen der Muskelzellen aus den in Abs. 2 und 3

besprochenen Gründen ebenfalls als unspezifische Zellreaktion aufzufassen.

Im Unterschied zu den anderen Pharmaka bewirkte Tremorin in der Konzentration von 10^{-3} M die Bildung zahlreicher kleiner Bläschen bei Kulturen des Stadiums 22 - 23 (Kulturen anderer Stadien wurden nicht mit Tremorin behandelt). Diese Reaktion kann als eine unspezifische Zellschädigung durch toxischen Einfluß betrachtet werden. Bei diesem Phänomen wurden ebenfalls keine kontinuierlich verlaufende Abstufungen der Schädigungen bei steigender Konzentration beobachtet. Bei Behandlung mit der Konzentration von 10^{-4} M war der Kulturverlauf normal.

Worin sind nun die Gründe dafür zu suchen, daß keine spezifischen pharmakologischen Wirkungen bei den Zellkulturen beobachtet werden konnten ?

Die Zellkulturen zeigten einen Entwicklungsverlauf, der in vieler Hinsicht einer Entwicklung *in vivo* wie oben beschrieben vergleichbar ist. Deswegen kann davon ausgegangen werden, daß die zellulären Enzymsysteme in den Kultursystemen *in vitro* ebenfalls funktionsfähig sind, so daß die biochemische Weiterverarbeitung des durch den cholinergen Rezeptor der Zellmembran vermittelten Impulses ablaufen kann. Man kann voraussetzen, daß die angewandten Pharmaka aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften einen Zugang zum Rezeptor finden. Ohnehin wurde eine große Anzahl von Pharmaka mit verschiedenen Lösungseigenschaften benutzt. Es kann also angenommen werden, daß durch spezifische Behandlung der cholinerge Rezeptor der Zellmembran beeinflußt werden kann, und somit eine Stoffwechseländerung der Zelle induziert wird.

Für die Unbeeinflußbarkeit des Kulturverlaufs durch spezifische cholinerge Pharmakonwirkung können drei Erklä-

rungen angeführt werden:

1. Bei den durchgeführten Experimenten wurden die Pharmaka einmalig den Zellkulturen zugegeben und nur bei Mediumaustausch nach wenigen Tagen erneuert. Somit war die Pharmakonkonzentration in der Nährlösung konstant. Möglicherweise ist eine Beeinflussung des Zellstoffwechsels durch cholinerge Pharmaka nur über andere Anwendungsmethoden zu erreichen. Eine Änderung des Zellstoffwechsels wäre beispielsweise durch rhythmisch stattfindende Konzentrationsänderung des Pharmakons am Rezeptor vorstellbar, wie es innerhalb des Nervensystems im synaptischen Spalt geschieht.

2. Es besteht die Möglichkeit, daß die Pharmaka in der Lage waren, den Zellstoffwechsel zu beeinflussen und eine Änderung der Kulturentwicklung zu bewirken. Diese pharmakologischen Effekte entzogen sich jedoch den Beobachtungen. Eventuell auftretende Unterschiede könnten bei der histochemischen Darstellung der Cholinesterase-Aktivität und Knorpelgrundsubstanz nicht erfaßt worden sein.

3. Wie in der Einleitung erwähnt wurde, verursachen cholinerge Substanzen während der Embryonalentwicklung von Hühnchen in vivo u.a. Mißbildungen der Extremitäten (LANDAUER, 1977; MC BRIDE, 1980). Acetylcholin-Antagonisten hemmen neben Serotonin-Antagonisten die Gastrulation bei Seeigelembryonen (GUSTAFSON und TONEBY, 1970). Hühnchenembryonen im Primitivstreifenstadium (Stadium 4) reagieren bei Behandlung mit Atropin mit einer Verdickung des Primitivstreifens und mit Gewebsdefekten im Mesenchym und Entoderm (PENNER und BRICK, 1977). Pilocarpin kann diese Wirkung antagonisieren. Hier scheint Atropin eine Hemmung der Wanderung der von DREWS et al. (1966) beschriebenen

Cholinesterase-positiven Tropfenzellen zu bewirken, wodurch die beschriebenen Veränderungen entstehen. Da Pilocarpin die Atropinwirkung aufhebt, könnte dieser Effekt über eine spezifische cholinerge Rezeptorwirkung erfolgen. Diese Ergebnisse bei Behandlung mit cholinergen Substanzen wurden bei lebenden Embryonen erzielt. Wie oben beschrieben ahmen die Zellkulturen in vitro die Extremitätenentwicklung in vivo bezüglich der Differenzierung der Mesenchymzellen in Knorpelhäufchen und Muskelzellen nach. Die für die Entwicklung in vivo charakteristische Formbildung der Muskulatur und Knorpelanlagen wird in vitro jedoch nicht nachgebildet. Es wäre denkbar, daß cholinerge Substanzwirkungen nur eine Veränderung der Formentwicklung von Knorpel- und Muskelgewebe bewirken, wie dies bei LANDAUER, MC BRIDE, GUSTAFSON u. TONEBY und PENNER u. BRICK beschrieben wurde, während die Zelldifferenzierung in vitro möglicherweise von cholinergen Substanzen nicht beeinflußt werden kann. Die von FLINT (1980) beobachtete Zunahme der Knorpelbildung in Mesenchymzellkulturen von Rattenextremitätenknorpel unter Eserinbehandlung stimmt mit den hier beobachteten Reaktionen bei mesenchymalen Zellen von Hühnchen unter Eserinbehandlung nicht überein. Es müßte genauer untersucht werden, unter welchen Bedingungen die Entwicklung einer Mesenchymzellkultur aus Rattenextremitätenknorpel mit einer Mesenchymzellkultur von Hühnchenextremitätenknorpel verglichen werden kann.

Der Acetylcholin-Agonist Carbachol bewirkte eine Induktion der Cholinesterase-Aktivität in Knorpelhäufchen und Muskelzellen. Die eine vermehrte Cholinesterase-Aktivität anzeigende verstärkte Braunfärbung war bei den mit Carbachol behandelten Kulturen homogen; konzentrationsabhängige Abstufungen zwischen 10^{-6} M und 10^{-2} M waren vorhanden. Obwohl quantitative Auswertungen von histochemischen Reak-

tionen sehr ungenau sind, kann davon ausgegangen werden, daß die verstärkte Braunfärbung der mit Carbacnol behandelten Kulturen einen echten Anstieg der Cholinesterase-Aktivität darstellt. Die Gestaltentwicklung und die Bildung von Knorpelgrundsubstanz wurden von Carbachol nicht beeinflußt; die Größe der Knorpelhäufchen und die Anzahl der Muskelzellen zeigten keine signifikanten Abweichungen. Toxische Reaktionen traten nicht auf.

Wie in der Einleitung erwähnt wurde, stellten FLUCK et al. (1980) eine Zunahme der Aggregation von disaggregierten Zellen des Medaka bei Carbacholbehandlung (10^{-5} M) und eine Abnahme der Aggregation bei d-Tubocurarinbehandlung fest. Das Aggregationsverhalten wurde innerhalb der ersten Stunde nach der Aussaat beobachtet. Es kann nicht beurteilt werden, ob in der vorliegenden Arbeit die mesenchymalen Zellen von Hühnchenextremitäten gleich nach Aussaat ähnliche Aggregationsänderungen bei Carbacholbehandlung zeigten, da in dieser Arbeit die von FLUCK et al. durchgeführten Beobachtungsmethoden nicht angewandt wurden.

PATTERSON et al. (1979) beobachteten bei Muskelzellkulturen, die vom Musculus pectoralis von elf Tage alten Hühnchenembryonen stammten, bei Behandlung mit dem Calziumantagonisten Verapamil einen ähnlichen Anstieg der Cholinesterase-Aktivität wie bei den hier durchgeführten Experimenten mit Carbacholbehandlung. Sie konnten nachweisen, daß bei Verapamilbehandlung die Cholinesterase-Aktivität im intrazellulären Bereich ansteigt, während im Kulturmedium die Cholinesterase-Aktivität abnimmt. Die Proteinsyntheseleistung und der gesamte zelluläre Proteingehalt wird jedoch durch Verapamil nicht beeinflußt. Hat Carbachol eine mit Verapamil vergleichbare Hemmwirkung auf die zelluläre Ausschleusung von Cholinesterase oder bewirkt Carbachol eine Stimulation der Synthese von Cholinesterase de novo ?

Durch Untersuchungen über die Verteilung von Cholinesterase im intrazellulären Raum und im Kulturmedium müßte dieser Frage in weiteren Experimenten nachgegangen werden.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von muscarinartigen Acetylcholin-Agonisten und Acetylcholin-Antagonisten auf die Entwicklung von disaggregiertem Mesenchym aus der Extremitätenknospe des Hühnchenembryos *in vitro* untersucht. Mit der Behandlung sollte das in der Extremitätenknospe vorhandene muscarinartige cholinerge System beeinflußt werden.

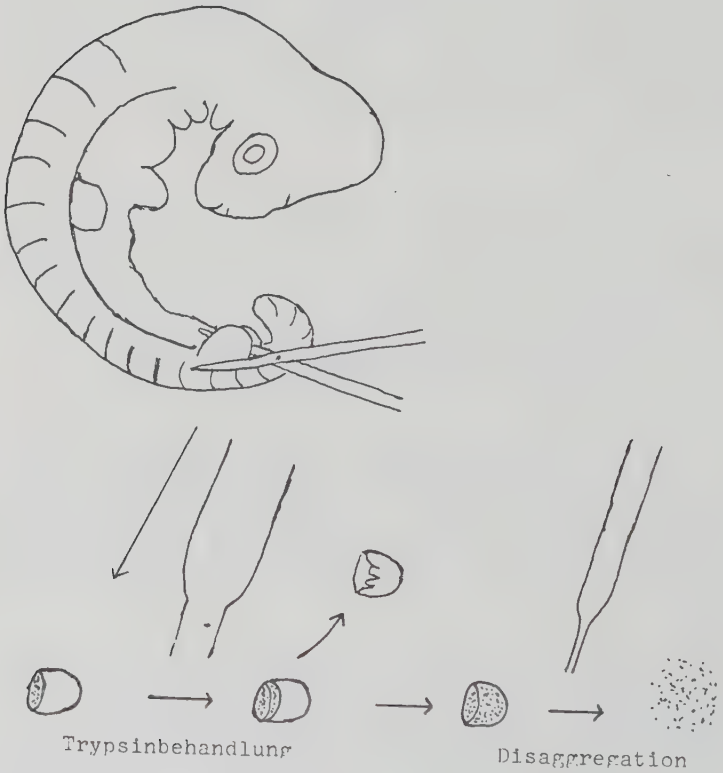
Die mesenchymalen Zellen wurden auf Gewebekulturplatten gezüchtet. Sie differenzierten sich zu Knorpelhäufchen und Muskelzellen. Die Differenzierung entsprach der Entwicklung *in vivo*. Sie erfolgte mit einer zeitlichen Verzögerung von zwei Tagen. Diese Verzögerung ist auf die Disaggregation des Gewebes zurückzuführen.

Die eingesetzten Pharmaka hatten in Konzentrationen unter 10^{-4} M keinen Einfluß auf die Zellkulturen. Sowohl die morphologische Entwicklung als auch das Auftreten der Cholinesterase-Aktivität und die Bildung von Knorpelgrundsubstanz zeigten keine Unterschiede gegenüber unbehandelten Kulturen.

Bei Behandlung mit Atropin, Chlorpromazin, Eserin, Pilocarpin und Tremorin in Konzentrationen über 10^{-4} M rundeten sich die Zellen ab und lösten sich vom Boden der Kulturplatten. Es handelte sich um eine toxische Wirkung in nicht physiologischen Konzentrationsbereichen.

Unter den Agonisten zeigte Carbachol eine abstufbare Induktion der Cholinesterase-Aktivität im Konzentrationsbereich von 10^{-6} M bis 10^{-2} M. Sie war jedoch nicht mit einer Änderung der morphologischen Differenzierung der Kulturen verbunden.

Abbildung 1



Gewinnung der Mesenchymsuspension aus der Extremitätenknospe

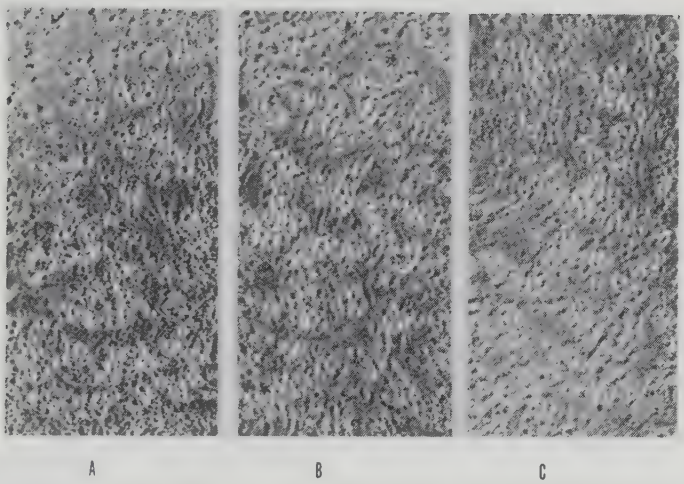


Abbildung 2
Mesenchym aus der Extremitätenknospe des Stadiums 22 - 23. 24 Stunden alte Kultur. Lebendaufnahme. A: Unbehandelte Kultur. B: Kultur mit Eserinbehandlung (5×10^{-4} M). C: Kultur mit Atropinbehandlung (5×10^{-4} M). Durch die Medikamentenzugabe ergaben sich keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. Phasenkontrast. Vergrößerung x 96.

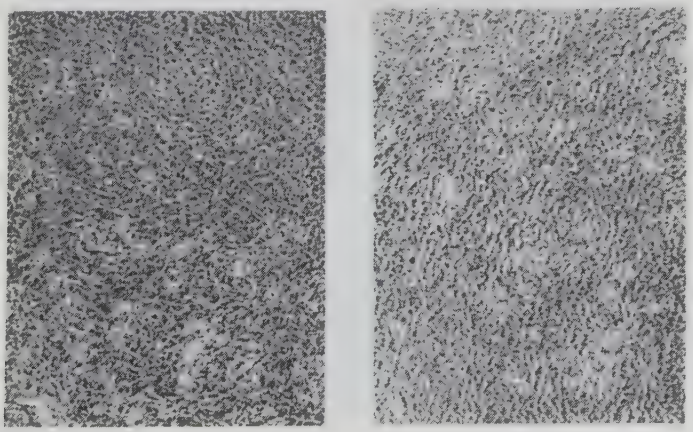


Abbildung 3
Mesenchym aus der Extremitätenknospe des Stadiums 22 - 23. 48 Stunden alte Kultur. Lebendaufnahme. A: Unbehandelte Kultur. B: Kultur mit Pilocarpinbehandlung (10^{-4} M). Runde Zellhäufchen aus Chondroblasten mit dazwischen liegenden Myoblasten. Durch die Medikamentenzugabe ergaben sich keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. Phasenkontrast. Vergrößerung x 96.

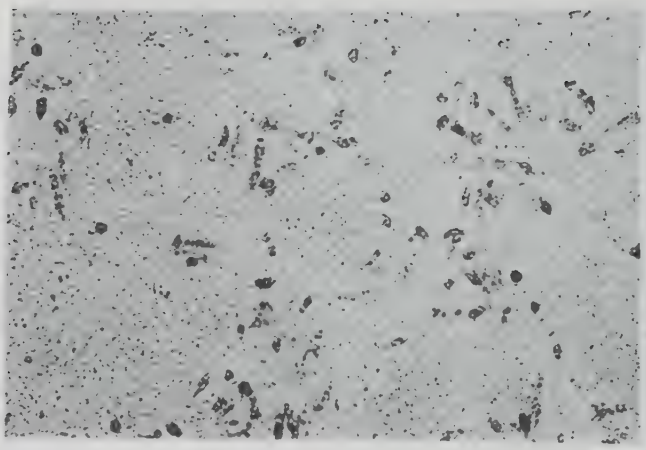


Abbildung 4
Mesenchym aus der Extremitätenknospe des Stadiums 22 - 23. Drei Tage alte unbehandelte Kultur.
Cholinesterase-Nachweis. Aktivität in Muskelzellen und Knorpelhäufchen. Durchlicht. Vergrößerung x 120.

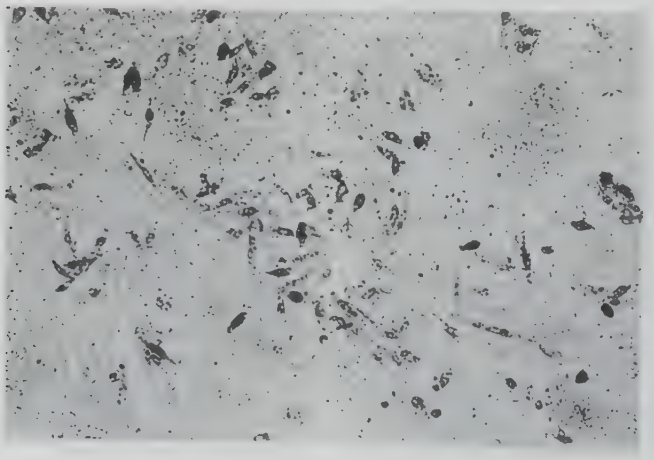


Abbildung 5
Mesenchym aus der Extremitatenknospe des Stadiums 22 - 23. Drei Tage alte Kultur. Behandlung mit Atropin (10^{-4} M).
Cholinesterase-Nachweis. Aktivitat in Muskelzellen und Knorpelhaufchen. Durch die Medikamentenzugabe ergaben sich keine Veranderungen im Vergleich zur Kontrolle. Durchlicht. Vergrößerung x 120.

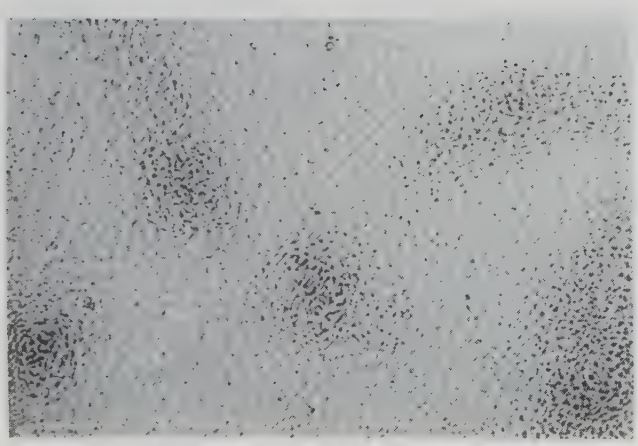


Abbildung 6
Mesenchym aus der Extremitätenknospe des Stadiums 22 - 23. Sechs Tage alte unbehandelte Kultur. Färbung mit Dimethylmethylenblau. Die dunklen Bezirken sind im Präparat leuchtend rot (Metachromasie), während die übrigen Bezirke blau gefärbt sind. Nachweis von Knorpelgrundsubstanz in den Knorpelhäufchen. Durchlicht. Vergrößerung x 120.

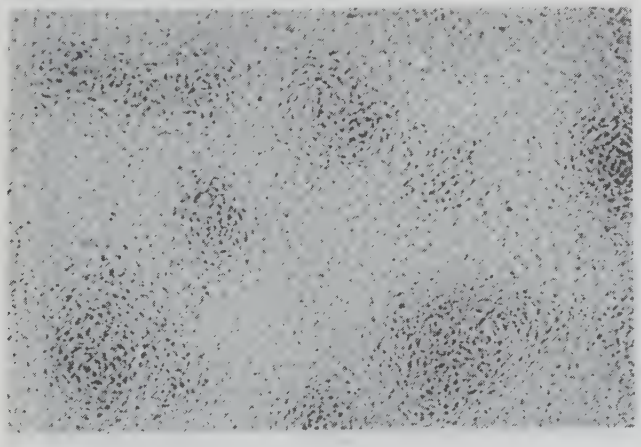
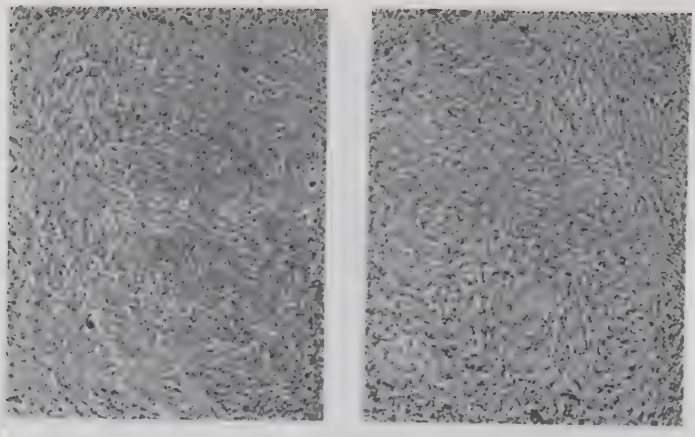


Abbildung 7
Mesenchym aus der Extremitätenknospe des Stadiums 22 - 23. Sechs Tage alte Kultur. Behandlung mit Atropin (10^{-4} M). Färbung mit Dimethylmethylenblau. Die dunklen Bezirke sind im Präparat leuchtend rot (Metachromasie), während die übrigen Bezirke blau gefärbt sind. Durch die Medikamentenzugabe ergaben sich keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. Nachweis von Knorpelgrundsubstanz in den Knorpelhäufchen. Durchlicht. Vergrößerung x 120.



A B

Abbildung 8
Mesenchym aus der Extremitätenknospe des Stadiums 19 - 20. Drei Tage alte Kultur. Lebendaufnahme. A: Unbehandelte Kultur. B: Kultur mit Atropinbehandlung (10^{-4} M). Runde Zellhaufchen aus Chondroblasten mit dazwischen liegenden Myoblasten. Durch die Medikamentenzugabe ergaben sich keine Veranderungen im Vergleich zur Kontrolle. Phasenkontrast. Vergrößerung x 96.

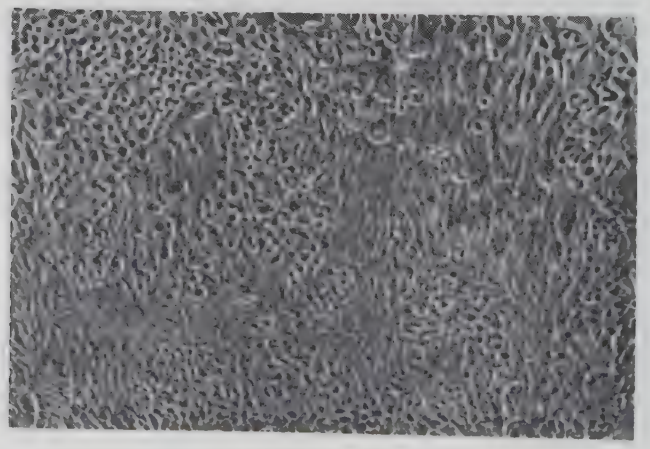


Abbildung 9
Cholinesterase-negative Knorpelzellkultur. Zwei Tage nach Aussaat in die 96-Loch-Testplatte. Keine Behandlung. Phasenkontrast. Vergrößerung x 120.

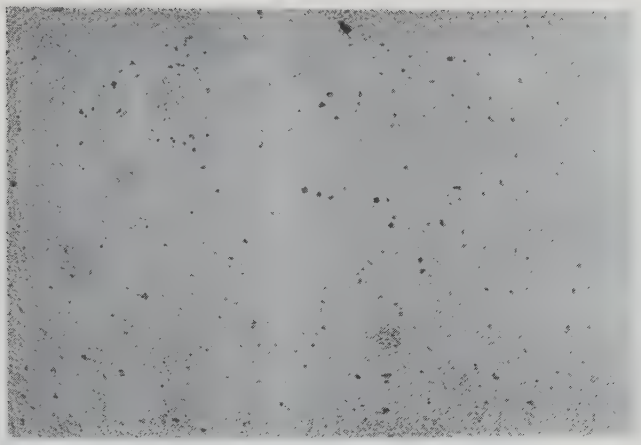


Abbildung 10
Mesenchym aus der Extremitätenknospe des Stadiums 24. Drei Tage alte Kultur. Behandlung mit Eserin (10^{-3} M). Cholinesterase-Färbung. Stark Cholinesterase-aktive, abgerundete Muskelzellen zwischen den Cholinesterase-aktiven Knorpelhäufchen. Durchlicht. Vergrößerung x 96.

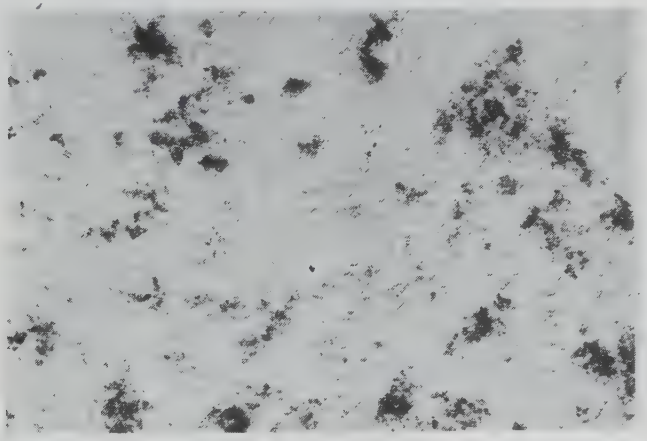


Abbildung 11
Mesenchym aus der Extremitätenknospe des Stadiums 24. 24 Stunden alte Kultur. Lebendaufnahme. Behandlung mit Pilocarpin (10^{-3} M). Tote, sich ablösende Zellen und Zelltrümmer neben am Boden ausgebreiteten Fibrozyten. Phasenkontrast. Vergrößerung x 120.

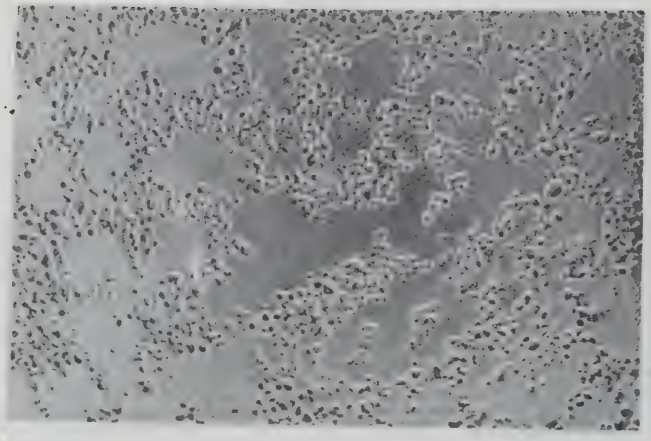


Abbildung 12
Cholinesterase-negative differenzierte Knorpelzellkultur. 24 Stunden nach Aussaat in die 96-Loch-Testplatte. Behandlung mit Atropin (10^{-3} M). Abrundung und Ablösung der Knorpelzellen vom Boden. Phasenkontrast, Vergrößerung x 120.

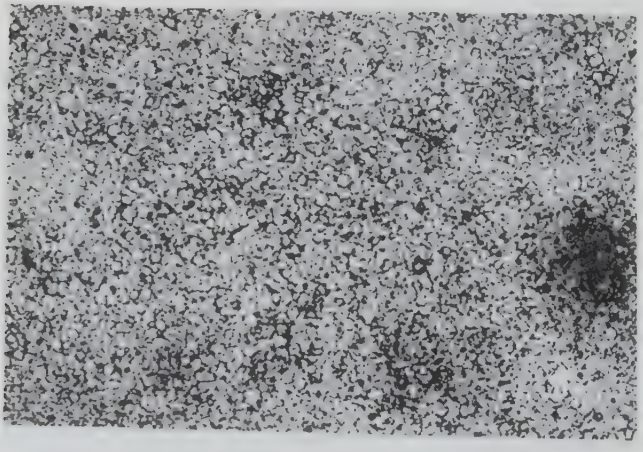


Abbildung 13
Mesenchym aus der Extremitätenknospe des Stadiums 22 - 23. Drei Tage alte Kultur. Behandlung mit Tremorin (10^{-3} M). Cholinesterase-Farbung. Pflastersteinstruktur bei gestörter Zelldifferenzierung. Durchlicht. Vergroßerung x 120.

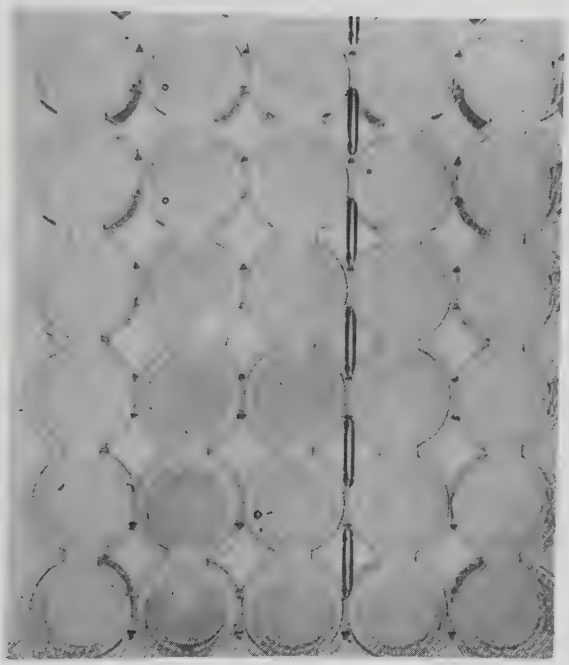
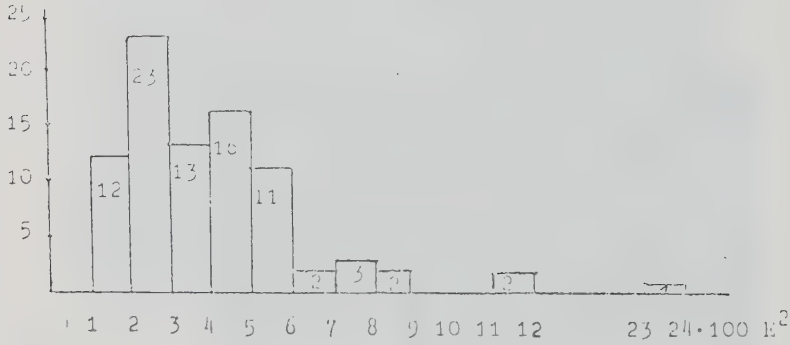
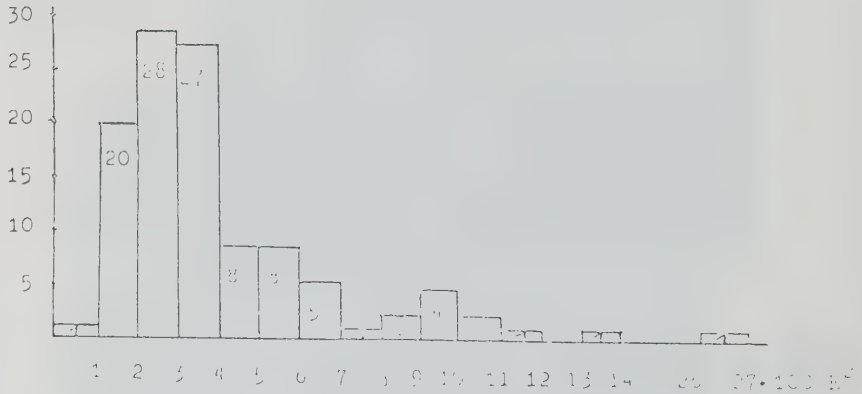


Abbildung 14
Ausschnitt einer 96-Loch-Testplatte. 7 mm Lochdurchmesser. Mesenchym aus der Extremitätenknospe des Stadiums 22 - 23. Drei Tage alte Kultur. Linke senkrechte Lochreihe: Unbehandelte Kulturen. Zweite bis fünfte senkrechte Lochreihe: Mit Carbachol behandelte Kulturen in absteigender Konzentration von 10^{-2} M bis 10^{-5} M. Konzentrationsabhängige Induktion der Cholinesterase-Aktivität durch Carbachol (Im Präparat vermehrte Braunfärbung).

Abbildung 15



Kontrollkultur



Carbacholbehandlung

Ausmessung der Fläche der Knorpelhaufchen bei Kontrollkulturen und bei Carbacholbehandlung (10^{-3} M).

Meßaufbau: Über einen Zeichenspiegel wurde das mikroskopische Bild der Kulturen auf ein Digitalisiertablett übertragen. Die Umrisse der Knorpelhäufchen wurden mit dem Sensor umfahren.
Abszisse: Fläche der Knorpelhaufchen in E^2 (arbiträre Einheit).
Ordinate: Anzahl der Knorpelhäufchen.

Der Vergleich der beiden Haufigkeitsverteilungen mit dem Chi-Quadrat-Test ergab: $\chi^2 = 9,98$, FG = 5, $P > 0,05$. Die Annahme, daß beide Haufigkeitsverteilungen aus einer Grundgesamtheit stammen, kann nicht widersprochen werden.

Tabelle 1
Die Wirkung der Pharmaka auf die Zellkulturen in Abhängigkeit von Kulturstadium und Pharmakonkonzentration

Konzentration [M]		10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}	10^{-2}
Atropin	Stad. 19-20			Ø			
Abb. 8							
Abb. 2, 5,7	Stad. 22-23	Ø	ØØ	ØØ	S✝	S✝	✝
	Stad. 24	Ø	Ø	Ø		S	✝
Abb.12	diff. Knorp.		Ø	ØØ		ØØ✝	✝
Pilocarpin	Stad. 19-20			Ø			
Abb. 3	Stad. 22-23	Ø	Ø	ØØ	S✝	✝✝	✝
Abb.11	Stad. 24	Ø	Ø	ØØØ	✝	S✝✝	
	diff. Knorp.		Ø	ØØ		Ø✝✝	
Eserin	Stad. 19-20			Ø			
Abb. 2	Stad. 22-23	Ø	Ø	ØØ	✝✝	✝✝	✝
Abb.10	Stad. 24	Ø	Ø	ØØØ	✝	S✝✝	
	diff. Knorp.		Ø	ØØ		Ø✝✝	✝
Quinuclidinyl-Benzoat	Stad. 19-20					S	
	Stad. 22-23	Ø	Ø	Ø		SS	
	Stad. 24			Ø		SS	
	diff. Knorp.		Ø	Ø		ØØ	
Carbachol	Stad. 19-20					Ø	
	Stad. 22-23	Ø	Ø	ØØØ		ØØØ	ØØØ
	Stad. 24			Ø		Ø	Ø
	diff. Knorp.		Ø	Ø		ØØ	ØØ
Chlorprom.	Stad. 22-23			✝		✝	
Tremor. Abb. 13	Stad. 22-23			O		V	

Jedes Zeichen steht für ein Experiment.
Ø = normaler Kulturverlauf. S = Abrundung der Muskelzellen. V = Vakuolenbildung. ✝ = Abrundung und Ablösung aller Zellen vom Boden der Kulturplatte.

Tabelle 2

Anzahl der Muskelzellen pro definiertem Zählfeld.

	Kontrolle	Carbachol
A	491	508
B	533	553
C	487	582
D	483	510

T-Test für unpaare Stichproben

Kontrolle: N = 4
Arithmetisches Mittel = 498,5
Standardabweichung = 23,231

Carbachol: N = 4
Arithmetisches Mittel = 538,25
Standardabweichung = 35,799

T = 1,863 6 Freiheitsgrade

p(t) = 0,0559

Wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 zugrunde gelegt, kann eine statistisch signifikante Carbachol-Wirkung nicht nachgewiesen werden.

8. Literaturverzeichnis

ABERCROMBIE, M.: The basis of the locomotory behaviour of fibroblasts. Exp. Cell Res., Suppl. 8, 188-198 (1961)

CAPLAN, A. I.: Effects of the nicotinamide-sensitive teratogen 3-acetylpyridine on chick limb cells in culture. Exp. Cell Res. 62, 341-355 (1970)

CHRIST, B., HIRSCHBERG, M., JACOB, H. J., JACOB M.: Experimentelle Befunde zur Entwicklung der distalen Extremitätenmuskulatur. Verh. Anat. Ges. 73, 519-525 (1979)

DREWS, U.: Cholinesterase in embryonic development. Prog. Histochem. Cytochem. 7/3 (1975)

DREWS, U., DREWS, U.: Cholinesterase in der Extremitätenentwicklung des Hühnchens: I. Phasen der Cholinesterase-Aktivität in der jungen Knospe und bei Abgrenzung von Knorpel- und Muskelanlagen. Wilhelm Roux´ Arch. Entwicklungsmechan. Org. 169, 70-86 (1972)

DREWS, U., DREWS, U.: Cholinesterase in der Extremitätenentwicklung des Hühnchens: II. Fermentaktivität und Bewegungsverhalten der präsumptiven Knorpelzellen *in vitro*. Wilhelm Roux´ Arch. Entwicklungsmechan. Org. 173, 208-227 (1973)

DREWS, U., KUSSÄTHER, E., USADEL, K.-H.: Cholinesterase bei den Gestaltungsvorgängen in der Hühnerkeimscheibe. Naturwissenschaften 53, 556 (1966)

DREWS, U., KUSSÄTHER, E., USADEL, K.-H.: Histochemischer Nachweis der Cholinesterase in der Frühentwicklung der Hühnerkeimscheibe. Histochemie 8, 65-89 (1967)

FLINT, O. P.: The effects of sodium salicylate, cytosine arabinoside, and eserine sulphate on the rat limb buds in culture. Teratology of the limbs. (H.-J. Merker, H. Nau, D. Neubert, Eds.) Berlin, Walter de Gruyter, 325-338 (1980)

FLUCK, R. A.: Acetylcholine and acetylcholinesterase activity in early embryos of the medaka oryzias latipes a teleost. Dev. Growth Differ. 20, 17-25 (1978)

FLUCK, R. A., WYNSHAW-BORIS, A. J., SCHNEIDER, L. M.: Cholinergic molecules modify the in vitro behavior of cells from early embryos of the medaka oryzias latipes a teleost fish. Comp. Biochem. Physiol. 67, 29-34 (1980)

GUSTAFSON, T., TONEBY, M.: On the role of serotonin and acetylcholine in sea urchin morphogenesis. Exp. Cell Res. 62, 102-117 (1970)

HAMBURGER, V., HAMILTON, H. L.: A series of normal stages in the development of chick embryo. J. Morphol. 88, 49-92 (1951)

HILFER, S. R., SEARLS, R. L., FONTE, V. G.: An ultrastructural study of early myogenesis in the chick wing bud. Develop. Biol. 30, 374-391 (1973)

KARNOVSKY, M. J., ROOTS, L.: A "direct coloring" thiocholine method for cholinesterases. J. Histochem. Cytochem. 12, 219-221 (1964)

LANDAUER, W.: Cholinomimetic teratogens. Teratology 15, 33-42 (1977)

MATSUTANI, E., KURODA, Y.: Effect of lectins on chondrogenesis of cultured quail limb bud cells. Develop. Biol. 89, 521-526 (1981)

Mc BRIDE, W. G.: The effects of anticholinergic drugs on the development of the chick embryo. IRCS Medical Science 8, 537 (1980)

MILLER, R. J., HILEY, C.R.: Anti-muscarinic properties of neuroleptics and drug-induced parkinsonism. Nature 248, 596-597 (1974)

MINGATI, A., FALUGI, C.: An epithelial localization of the acetylcholinesterase in the ascidian ciona intestinalis embryos und larves. Acta Embryol. Morphol. Exper. n. s. 1, 143-155 (1980)

OZAKI, H.: Localization and multiple forms of acetylcholinesterase in sea urchin embryos. Dev. Growth Differ. 16, 267-279 (1974)

OZAKI, H.: Molecular properties und differentiation of acetylcholinesterase in sea urchin embryos. Dev. Growth Differ. 18, 245-257 (1976)

PARKER, C. L., PAULSEN, D. F., ROSEBROCK, J. A., HOOPER, W. C.: Inhibition of chondrogenesis by normal mouse serum in cultured chick limb cells. Exp. Cell Res. 130, 21-30 (1980)

PATTERSON, G. T., CISSON, C. M., ENTRIKIN, R. K., WILSON, B. W.: Verapamil-induced changes of muscle culture acetylcholinesterase. Can. J. Physiol. Pharmacol. 57, 1421-1426 (1979)

PENNER, P., BRICK, I.: Acetylcholinesterase and cell movement in the chick epiblast. American Society of Zoologists 17, 882 (1977)

SCHMIDT, H.: Muscarinic acetylcholine receptor in chick limb bud during morphogenesis. Histochem. 71, 89-98 (1981)

SCHRÖDER, C.: Characterization of embryonic cholinesterase in chick limb bud by colorimetry and disk elektrophoresis. Histochem. 69, 243-253 (1980)

SEARLS, R. L., HILFER, S. R., MIROW, S. M.: An ultrastructural study of early chondrogenesis in the chick wing bud. Develop. Biol. 28, 123-137 (1972)

SNYDER, S. H., CHANG, K. J., KUHAR, M. J., YAMAMURA, H. I.: Biochemical identification of the mammalian muscarinic cholinergic receptor. Federation Proc. 34, 1915-1921 (1975)

SOLURSH, M., REITER, R. S.: Evidence for histogenetic interactions during *in vitro* limb chondrogenesis. Develop. Biol. 78, 141-150 (1980)

TOEPFER, K.: Spektralphotometrische und histochemische Eigenschaften von 1:9 Dimethyl-Methylenblau als metachromatischem Farbstoff. Histochemie 21, 64-72 (1970)

UMANSKY, R.: The effect of cell population density on the developmental fate of reaggregating mouse limb bud mesenchyme. Develop. Biol. 13, 31-56 (1966)

Lebenslauf

Am 7. September 1957 wurde ich, Dirk Hofbauer, als Sohn des Bankkaufmanns Franz Hofbauer und seiner Ehefrau Irmgard geb. Füller in Pforzheim geboren.

Mit sechs Jahren trat ich in die Weiherbergschule in Pforzheim ein. Nach Abschluß der vierten Klasse wechselte ich ins humanistische Reuchlin-Gymnasium in Pforzheim über. Dort legte ich im Juni 1976 die Reifeprüfung ab.

Nachdem ich an der Universität Hohenheim vier Semester Biologie und Chemie (Lehramt) absolviert hatte, begann ich im Wintersemester 1978 an der Universität Ulm mit dem Medizinstudium. Nach Bestehen der ärztlichen Vorprüfung wechselte ich im Sommersemester 1980 an die Universität Tübingen. Im April 1983 bestand ich dort den zweiten Teil der ärztlichen Prüfung.

Anschließend absolvierte ich das Praktische Jahr im Rahmen des Medizinstudiums am Städtischen Krankenhaus in Pforzheim (Lehrkrankenhaus der Universität Heidelberg).

Den dritten Teil der ärztlichen Prüfung legte ich am 12.4.1984 ab.